

第 24 卷第 3 期
2004 年 5 月

环 境 科 学 学 报
ACTA SCIENTIAE CIRCUMSTANTIAE

Vol. 24, No. 3
May, 2004

文章编号: 0253-2468 (2004) 03-0492-06

中图分类号: Q939. 97

文献标识码: A

谷氨酸棒杆菌合成新型生物絮凝剂分批发酵过程的溶氧控制模式

何 宁¹, 李 寅², 陈 坚², 李清彪¹ (1. 厦门大学化学工程与生物工程系, 厦门 361005; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036)

摘要: 在 3 L 发酵罐上系统研究溶氧水平对谷氨酸棒杆菌菌体生长及新型生物絮凝剂 REA-11 合成的影响, 提出生物絮凝剂 REA-11 合成的分阶段供氧控制策略: 发酵过程 0~16 h 维持体积传氧系数 $k_L a$ 为 100 h^{-1} , 16 h 后降低 $k_L a$ 为 40 h^{-1} 至发酵结束, 整个发酵过程通气量保持在 $1 \text{ L L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. 采用该分阶段供氧控制策略, 生物絮凝剂最终产量达到 900 mg L^{-1} , 发酵周期缩短到 30 h, 比恒定 $k_L a$ 为 40 h^{-1} 条件下的 REA-11 产量 (549 mg L^{-1}) 提高了 64 %, 产率提高了 45 %, 生产强度也比 $k_L a$ 恒定为 40 h^{-1} , 100 h^{-1} 和 200 h^{-1} 的分批发酵过程分别提高了 81.2 %, 120 % 和 420 %, 实现了高细胞生长速率和高产物产率的统一.

关键词: 生物絮凝剂; 谷氨酸棒杆菌; 溶氧

Control module for dissolved oxygen in a novel biofloculant production from *Corynebacterium glutamicum*

HE Ning¹, LI Yin², CHEN Jian², LI Qingbiao¹ (1. Department of Chemical and Biological Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract: The effect of dissolved oxygen tension (DOT) on cell growth and flocculant production by *Corynebacterium glutamicum* CCTCC M201005 was systematically investigated in an automatic 3-litre fermentor. A stepwise oxygen supply strategy was employed to maintain the oxygen-transfer coefficient ($k_L a$) to be 100 h^{-1} in the first 16 hours of the fermentation, then to decrease $k_L a$ to be 40 h^{-1} till the end of fermentation, while the aeration rate was maintained to be $1 \text{ L L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ during the entire fermentation process. With this strategy the yield of REA-11 was greatly improved especially in the late period of fermentation. The ultimate flocculant yield reached 900 mg L^{-1} , improved by 63.9 %; $Y_{p/s}$ improved by 45 % and the fermentation time was shortened to 30 hours compared with those from the fermentation mode with constant $k_L a$ (40 h^{-1}). The productivity was also improved by 81.2 %, 120 % and 420 % compared with those from fermentations with different constant $k_L a$ set at 40 h^{-1} , 100 h^{-1} and 200 h^{-1} , respectively. High cell growth rate and high biofloculant production were thus simultaneously obtained with this stepwise oxygen supply strategy.

Key words: biofloculant; *Corynebacterium glutamicum*; dissolved oxygen

生物絮凝剂作为一种新型、高效水处理药剂,正在成为环保生物新材料的一个重要研究方向^[1,2]. 能否与化学合成絮凝剂竞争,取决于生物絮凝剂的生产成本和絮凝效果. 然而,生产成本过高目前仍然是生物絮凝剂取代化学合成絮凝剂走向市场的主要障碍,提高生物絮凝剂产量,降低其生产成本已成为当务之急^[3].

溶氧浓度 (DOT) 作为通风发酵控制中的关键参数之一,直接影响着发酵产品的生产过程

收稿日期: 2003-05-23; 修订日期: 2003-11-15

基金项目: 福建省青年科技人才创新项目 (编号 2002J044)

作者简介: 何 宁 (1974—), 女, 讲师 (博士), hening@xmu.edu.cn

和生产成本.生物絮凝剂作为好氧微生物的一类高分子代谢产物,溶氧浓度对于菌体生长和产物合成有着不可忽视的作用. Kurane^[4]曾经对 *R. erythropolis* S-1 合成生物絮凝剂 NOC-1 的溶氧条件进行了初步探讨.他发现,通气量过大, NOC-1 产量出现显著下降;当停止通气,仅仅维持 $500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的搅拌转速时, NOC-1 活性达到最大;而通气量的变化对该菌株生长未表现明显影响.除此之外,有关溶氧对生物絮凝剂合成影响的报道很少.可见,溶氧作为微生物代谢发酵过程中的一个重要参数,至今仍被国内外生物絮凝剂研究学者所忽视.

在前期的研究工作中,作者从土壤中筛选得到了一株絮凝剂产生菌谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* CCTCC M201005,该菌株能利用葡萄糖或蔗糖合成一种国内外均未见报道的以半乳糖醛酸为主要结构单元的新型高效生物絮凝剂 REA-11^[5,6].已经证实,该生物絮凝剂不仅具有比普通化学合成絮凝剂更强的絮凝净化效果,而且具有独特的脱色性能,尤其对难以脱色的糖蜜废水,其脱色效果最高可以达到 50 %^[7].

作者在对 REA-11 的发酵条件进行研究时发现,不同溶氧控制培养条件下,菌体生长和活性物质合成速率的变化具有较为明显的规律可循.为了更深入了解溶氧在生物絮凝剂 REA-11 合成中的作用,以便更好地控制发酵条件,提高生物絮凝剂产量,作者在 3 L 发酵罐上进一步系统研究了不同溶氧水平对 *C. glutamicum* 菌体生长及 REA-11 合成的影响,并在此基础上,提出合成生物絮凝剂 REA-11 的分阶段供氧控制策略,实现了高细胞生长速率和高产物产率的统一.

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

菌种为谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* CCTCC M201005.斜面培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):葡萄糖 10,酵母膏 1,牛肉膏 1,胰蛋白胨 2, FeSO_4 微量,琼脂 20, pH 值 7.2.种子培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):葡萄糖 10,酵母膏 0.5,尿素 0.5, KH_2PO_4 0.1, NaCl 0.1, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, pH 值 8.0.发酵培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):蔗糖 10,玉米浆 1,尿素 1, KH_2PO_4 0.1, K_2HPO_4 0.1, NaCl 0.1, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, pH 值 8.0.

1.2 培养方法

1.2.1 种子培养 于新鲜斜面上取一环菌,接至装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,于 28°C 、 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 16 h.

1.2.2 摇瓶培养 将培养 16 h 种子液按 5 %接种量,接入装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,于 28°C 、 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养.

1.2.3 发酵罐培养 将培养 12 h 种子液按 5 %接种量,接入 3 L 发酵罐.发酵罐装液量 2 L,通气量 $1\text{ L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.发酵温度 28°C ,溶氧自动显示.本文所指的溶氧(DOT)为相对溶氧水平,即:将培养基未接种时的饱和溶氧水平设定为 100 %,发酵过程中显示的溶氧水平为相对于饱和溶氧的分数.通过控制不同的搅拌转速实现不同的体积传氧系数($k_L a$).

1.3 分析方法

将含有 4 mL 发酵液的离心管置于台式高速离心机中,于 $10000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,取上清液进行分析测定.

1.3.1 絮凝活性测定方法 取 40 mL (1 %)高岭土溶液加至 50 mL 刻度试管中,然后依次加入 2.5 mL (1 %) CaCl_2 溶液和 1 mL 待测样品,蒸馏水加至满刻度,充分混合后,迅速倒入比色杯

中,静置 5 min 后于 550 nm 处测定吸光度.以空白培养基代替待测样品作对照.以样品 550 nm 处的吸光度值($O.D._{550\text{ nm}}$)高于 0.30 的最低稀释倍数(D)作为絮凝活性的计算依据.絮凝活性计算如下(以絮凝率表示)^[6]:

$$R = (B - A) / B \times 100 \times D \quad (1)$$

式中: R 为絮凝率; A 为待测样品的 $O.D. (550\text{ nm})$ 值; B 为对照组的 $O.D. (550\text{ nm})$ 值; D 为稀释倍数.

1.3.2 葡萄糖质量浓度的测定 采用 3,5-二硝基水杨酸比色法进行测定^[8].

1.3.3 半乳糖醛酸含量的测定 按照 Dishe 的方法进行测定^[9].

1.3.4 $k_L a$ 的测定 在清水体系中采用亚硫酸盐法测定^[10].

1.4 细胞干重测定

取发酵液 5 mL,7000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,蒸馏水洗涤菌体 2 次,105 °C 干燥至恒重后称重,计算细胞干重(DCW).

2 结果与讨论

2.1 不同 $k_L a$ 下 *C. glutamicum* CCTCC M201005 细胞生长及合成生物絮凝剂 REA-11 的动力学特征

作者在 3 L 发酵罐上系统研究了不同 $k_L a$ 下 *C. glutamicum* CCTCCM201005 合成 REA-11 过程中的细胞干重、生物絮凝剂质量浓度及葡萄糖质量浓度变化,并利用 origin 作图软件,对发酵过程参数数据进行处理,得到不同 $k_L a$ 下 *C. glutamicum* CCTCCM201005 发酵过程动力学参数的变化曲线以及发酵过程中生物絮凝剂和细胞产率的变化曲线.

其中 μ , $Y_{x/s}$, q_p , $Y_{p/s}$ 的定义为:

$$\mu = dx/(xdt), Y_{x/s} = dx/ds, q_p = dp/(xdt), Y_{p/s} = dp/ds \quad (2)$$

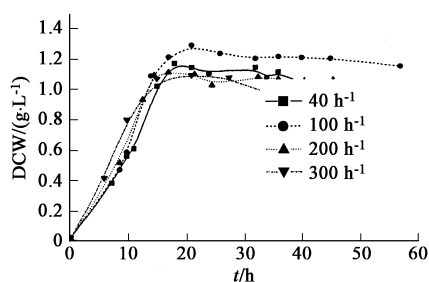


图1 不同 $k_L a$ 下 *C. glutamicum* CCTCC M201005 菌体生长过程曲线

Fig.1 Time-course curve of cell growth at different $k_L a$

式中, μ 为细胞的比生长速率(h^{-1}); $Y_{x/s}$ 为细胞产率($g \cdot g^{-1}$); q_p 为絮凝剂生成速率(h^{-1}); $Y_{p/s}$ 为絮凝剂产率($g \cdot g^{-1}$).

2.1.1 不同 $k_L a$ 下 *C. glutamicum* CCTCC M201005 菌体细胞的生长 图1,图2分别为不同 $k_L a$ 下 *C. glutamicum* CCTCC M201005 菌体生长过程曲线、菌株的比生长速率及细胞产率时间变化曲线.

分析各图可得以下结论:(1)细胞生长主要阶段在发酵的前 15 h 左右,20 h 之后,细胞生长开始进入稳定期;(2)相对来讲,适当低的 $k_L a$ 更有利于生物量的增加,菌体生长的最佳 $k_L a$ 为 $100 h^{-1}$, $k_L a$ 增加虽然能

够加快细胞代谢速率,缩短细胞生长周期,但同时也会对细胞生长造成毒害作用,从而影响最终菌体细胞生长量.

2.1.2 不同 $k_L a$ 下生物絮凝剂 REA-11 的合成 图3为不同 $k_L a$ 下生物絮凝剂 REA-11 产量的时间变化曲线.

由图3可见,在 3 L 罐上进行发酵, $k_L a$ 对絮凝剂的合成影响较大,随 $k_L a$ 增加,当发酵进行到大约 18 h 后,絮凝活性开始出现显著差距,尤其当 $k_L a$ 升高至 $200 h^{-1}$ 时,其发酵所得絮

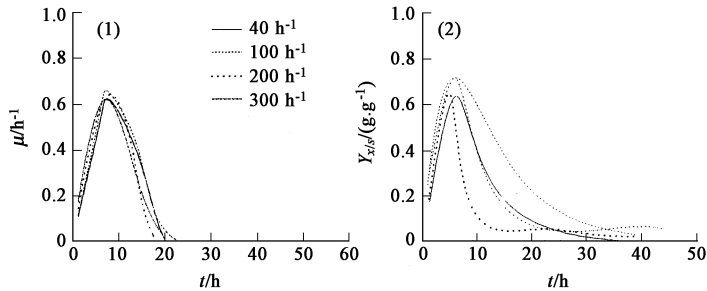


图 2 不同 $k_L a$ 下 *C. glutamicum* CCTCC M201005 细胞比生长速率(μ) (1)和细胞产率($Y_{X/S}$) (2)时间变化曲线

Fig. 2 Time-course curves of cell growth rate (μ) (1) and biomass ratio ($Y_{X/S}$) (2) at different $k_L a$

凝活性比 $k_L a$ 恒定为 40 h^{-1} 时降低了 70 % 以上;当 $k_L a$ 达到 300 h^{-1} 时,絮凝活性几乎消失.

$k_L a$ 的增大亦会同时导致产物产率及产物生成速率的显著下降(图 4). 产物产率和产物生成速率均在 $k_L a$ 为 40 h^{-1} 的发酵条件下达到最大,当发酵进行到 16 h 左右时, q_p 出现迅速增加,一直到发酵进行大约 25 h 左右, q_p 均维持在一个较高的水平,表明此阶段为产物合成的主要阶段. 与细胞合成相比,产物的大量合成可能依赖于更低的溶氧浓度.

2.1.3 不同 $k_L a$ 下葡萄糖的消耗过程 不同 $k_L a$ 下葡萄糖消耗情况则表明,葡萄糖的消耗在不同的溶氧条件

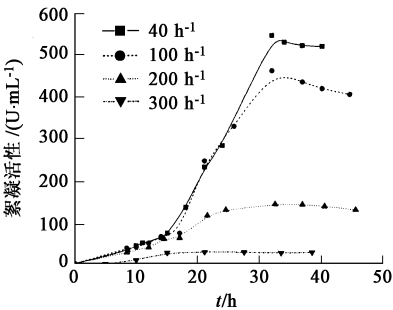


图 3 不同 $k_L a$ 下生物絮凝剂 REA-11 合成曲线

Fig. 3 Synthesis curve of REA-11 at different $k_L a$

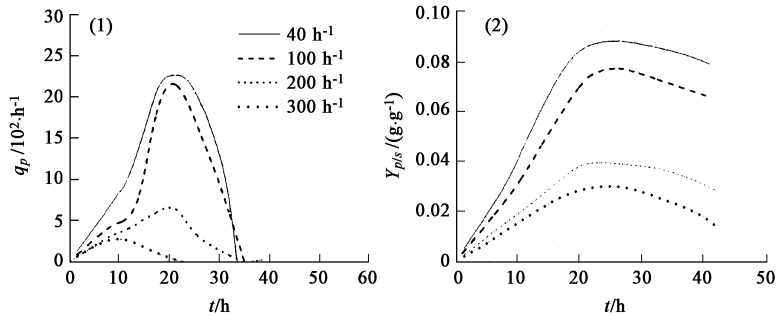


图 4 不同 $k_L a$ 下生物絮凝剂 REA-11 生成速率(q_p) (1)及产率($Y_{p/s}$) (2)时间变化曲线

Fig. 4 Time-course curve of REA-11 production ratio (q_p) (1) and productivity ($Y_{p/s}$) (2) at different $k_L a$

下呈现基本相同的变化趋势,整个发酵过程的消耗速率也相差不大,然而,无论采用何种恒定 $k_L a$,均存在残糖偏高的局限性.

2.2 REA-11 分批发酵过程的溶氧变化情况

由图 5 可见,发酵初期,菌体耗氧速率明显快于供氧速率,表现为溶氧的迅速下降,在菌体生长进入对数生长期后,发酵液中的溶氧浓度降到最低. 大约在 18 h 后,耗氧速率开始逐渐减

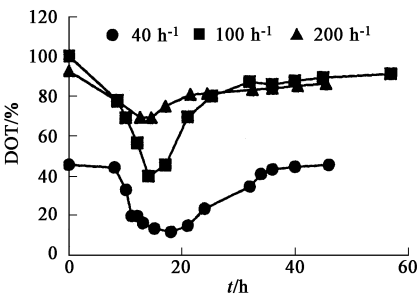


图5 不同 $k_L a$ 下 *C. glutamicum* 分批发酵过程发酵体系溶氧的时间变化曲线

Fig.5 Changes of dissolved oxygen in the fermentation medium at different $k_L a$

慢,并随着发酵时间的进一步延长,发酵体系溶氧浓度回升.发酵初期氧气的大量消耗主要用于 *C. glutamicum* CCTCC M201005 菌体细胞的生长,而发酵后期产物合成阶段氧耗的减少再次证明产物的合成可能并不需要太多的氧. Kurane 在研究生物絮凝剂 NOC-1 的分批发酵中也发现了类似的规律^[4].

2.3 分阶段供氧控制模式的提出与实验验证

以上分析发现,菌体的快速生长期和产物的最大合成速率期存在一定的时间差,而且细胞生长和产物合成对发酵体系中溶氧的要求存在差异.基于此,为了兼具高的细胞产率和高的产物产率,同时提高葡萄糖的利用率,减少原料的浪费,作者提出了 *C. glutamicum* CCTCC M201005 合成生物絮凝剂 REA-11 的分阶段供氧控制策略:0~16 h 维持 $k_L a$ 100 h⁻¹,16 h 后降低 $k_L a$ 为 40 h⁻¹至发酵结束,整个发酵过程通气量保持在1 L L⁻¹ min⁻¹.

分阶段供氧控制的发酵过程曲线如图 6 所示.为了更深入地理解不同 $k_L a$ 下发酵过程的特征,作者同时列出了 $k_L a$ 为 40 h⁻¹的恒定溶氧条件下的发酵过程曲线(图 6-2),并对不同供氧方式下发酵过程的主要参数进行了比较(表 1).

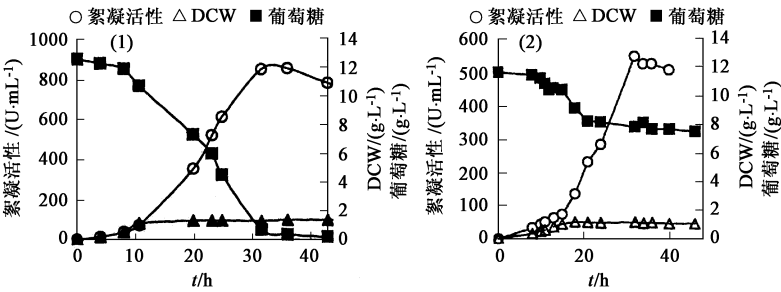


图6 采用分阶段供氧控制模式(1)与恒定 $k_L a$ 为 40 h⁻¹(2)的分批发酵过程曲线

Fig.6 Time-course of batch processes with two-stage oxygen supply control mode (1) and batch fermentation at constant $k_L a$ of 40 h⁻¹ (2) In both case the aeration rate was maintained at 1 L L⁻¹ min⁻¹ during the fermentation process

表 1 不同供氧模式下的分批发酵过程参数比较

项目	恒定 $k_L a/h^{-1}$			分阶段供氧控制/ h^{-1}
	40	100	200	100 (0~16 h) 40 (>16 h)
REA-11 产量/(mg L ⁻¹)	549.0	463.2	140.1	900.0
生产强度/(mg L ⁻¹ h ⁻¹)	16.5	13.6	5.8	29.9
絮凝剂产率/(g g ⁻¹)	0.066	0.053	0.016	0.096
DCW/(g L ⁻¹)	1.16	1.20	1.23	1.20
细胞产率/(g g ⁻¹)	0.137	0.138	0.136	0.128
比生长速率/h ⁻¹	0.096	0.097	0.137	0.135
残糖/(g L ⁻¹)	1.56	1.28	0.98	0.66
葡萄糖消耗速率/(g L ⁻¹ h ⁻¹)	0.248	0.256	0.310	0.348
发酵周期/h	34	34	26	30

将图 6(1)与恒定供氧条件下($k_L a$ 40 h^{-1})的发酵过程曲线(图 6(2))对照,进入发酵后期阶段后,REA-11 产量出现大幅度提高,最终所得絮凝剂产量 900 mg L^{-1} ,比恒定 $k_L a$ 为 40 h^{-1} 条件下的絮凝剂产量(549 mg L^{-1})提高了 64%,发酵周期由 34 h 缩短到 30 h,葡萄糖消耗速率亦显著提高(0.348 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$),而菌体生长量与 $k_L a$ 恒定为 100 和 200 h^{-1} 时的基本相当。

从表 1 则可以更清楚地看到采用分阶段供氧控制模式优化 REA-11 的发酵过程非常有效。与控制恒定 $k_L a$ 进行发酵相比,在前者的发酵状态下,不仅絮凝剂产量出现大幅度提高,其生产强度也比 $k_L a$ 恒定为 40、100 和 200 h^{-1} 的分批发酵过程分别提高了 81.2%、120%和 420%;同时生物絮凝剂产率比 $k_L a$ 为 40 h^{-1} 的发酵过程提高 45%。

3 结论

1)在发酵前期阶段,适当低的 $k_L a$ 更有利于生物量的增加,谷氨酸棒杆菌生长的最佳 $k_L a$ 为 100 h^{-1} , $k_L a$ 的降低或增加均可使细胞的比生长速率或最终生物量出现降低。2)发酵体系 $k_L a$ 对絮凝剂的合成影响较大。在发酵的中后期阶段(18 h 后),随 $k_L a$ 增加,发酵液絮凝活性急剧下降:当 $k_L a$ 为 200 h^{-1} 时,其发酵所得絮凝活性比 $k_L a$ 恒定为 40 h^{-1} 时降低了 70%以上;当 $k_L a$ 升高至 300 h^{-1} 时,发酵液的絮凝活性几乎消失。 $k_L a$ 的增大同时导致产物产率及产物生成速率的显著下降。与细胞合成相比,产物的大量合成可能依赖于更低的溶氧浓度。3)提出了絮凝剂合成的分阶段供氧控制策略:0~16 h 维持 $k_L a$ 100 h^{-1} ,16 h 后降低 $k_L a$ 为 40 h^{-1} 至发酵结束,整个发酵过程通气量保持在 1 $\text{L L}^{-1} \text{min}^{-1}$ 。采用分阶段供氧控制模式合成生物絮凝剂不仅具有较高的葡萄糖消耗速率(0.348 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$),而且最终絮凝剂产量可达到近 900 mg L^{-1} ,絮凝活性 896 U mL^{-1} ,比恒定 $k_L a$ 为 40 h^{-1} 条件下的最高产量(549 mg L^{-1})提高了 64%,生产强度比 $k_L a$ 恒定为 40、100 和 200 h^{-1} 的分批发酵过程分别提高了 81.2%、120%和 420%,同时,生物絮凝剂产率比 $k_L a$ 为 40 h^{-1} 的发酵过程提高 45%,发酵周期由 34 h 缩短到 30 h。

参考文献:

- [1] Toeda K, Kurane R. Microbial flocculant from *Alcaligenes eutrophus* KT201[J]. Agric Biol Chem, 1991,55(11):2793—2799
- [2] Levy N, Bar-Or Y, Magdassi S. Flocculation of bentonite particles by a cyanobacterial bioflocculant[J]. Colloids and Surfaces, 1990,48(4):337—349
- [3] Kurane R, Hatamochi K, Kakuno T, et al. Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 grown on alcohols[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1994,58(2):428—429
- [4] Kurane R, Toeda K, Takeda K, et al. Culture condition for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*[J]. Agric Biol Chem, 1986,50(9):2309—2313
- [5] He N, Li Y, Chen J, et al. Identification of a novel bioflocculant from a newly isolated *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biochem Eng J, 2002,11(2):137—148
- [6] 何 宁,李 寅,陈 坚.一种新型蛋白聚糖类生物絮凝剂的分离纯化及组成分析[J].化工学报,2002,53(10):1022—1027
- [7] 何 宁. *Corynebacterium glutamicum* CCTCC M201005 合成新型生物絮凝剂 REA-11 的研究[D]. 江南大学,2002:102—103
- [8] Li Y, Chen J. Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli* [J]. Process Biochem, 1998,33(7):709—714
- [9] Dishe Z. A new specific color reaction of hexuronic acid[J]. Biol Chem, 1947,167(1):189—198
- [10] 伦世仪. 生化工程[M]. 北京:中国轻工业出版社,1993:70—71